



⑲ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 38 870 A 1**

⑥ Int. Cl.⁶:
C 07 K 5/02
A 61 K 38/07
C 12 P 17/16
C 12 N 1/20
// (C12N 1/20, C12R
1:00)

⑲ Aktenzeichen: 196 38 870.8
⑳ Anmeldetag: 23. 9. 96
㉓ Offenlegungstag: 26. 3. 98

DE 196 38 870 A 1

⑦① Anmelder:
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
(GBF), 38124 Braunschweig, DE

⑦④ Vertreter:
Patentanwälte Dr. Boeters, Bauer, Dr. Meyer, 81541
München

⑦② Erfinder:
Reichenbach, Hans, Prof. Dr., 38124 Braunschweig,
DE; Höfle, Gerhard, Prof. Dr., 38124 Braunschweig,
DE; Sasse, Florenz, Dr., 38124 Braunschweig, DE;
Steinmetz, Heinrich, 38124 Braunschweig, DE

⑤④ Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung, Herstellungsverfahren, Mittel und DSM 11
092

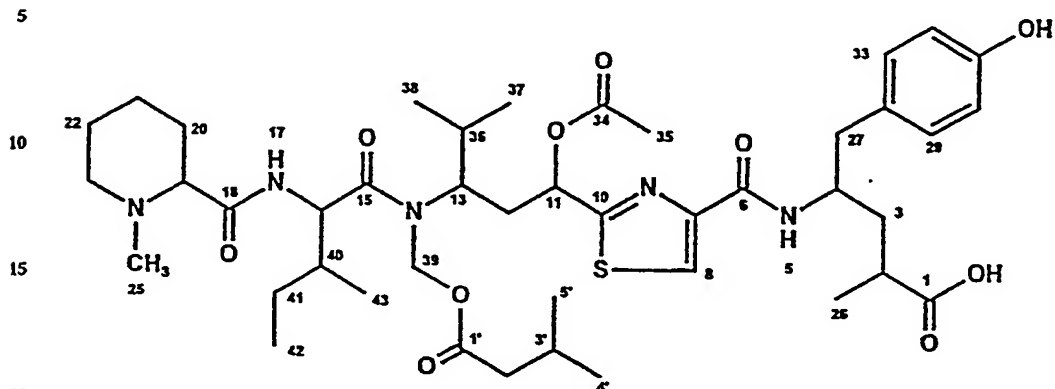
⑤⑦ Die Erfindung betrifft chemische Verbindungen mit anti-
mykotischer und cytostatischer Wirkung, ein Verfahren zu
ihrer Gewinnung aus dem Archangium gephyra-Stamm
DSM 11092, Mittel mit den Verbindungen und dem Stamm.

DE 196 38 870 A 1

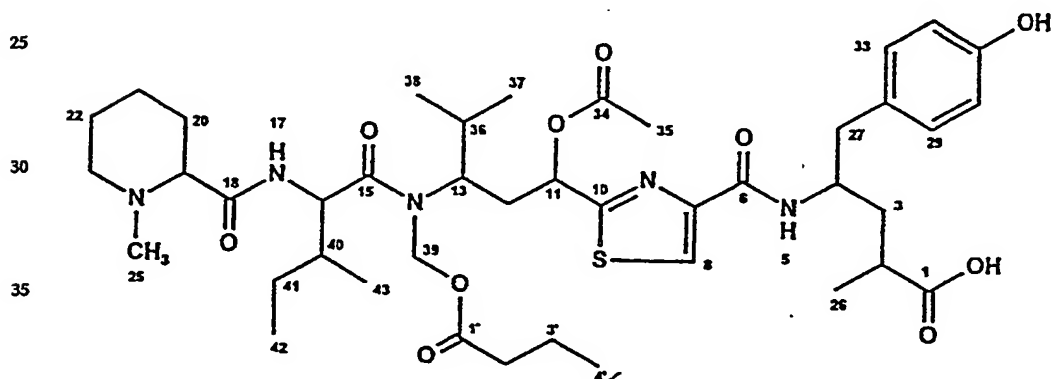
BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung

Gemäß einer ersten Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindung der Formel



Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindung der Formel



Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindung der Summenformel $C_{43}M_{65}N_5O_{10}S$ und mit den folgenden Parametern:

1H -NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin A);

^{13}C -NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin A);

UV-Spektrum (Methanol) λ_{max} (log epsilon): 225 (4,20), 250 (3,86) und 280 (3,20);

IR-Spektrum (KBr) ν : 3390, 2959, 2934, 2876, 1747, 1667, 1553, 1515 und 1233 cm^{-1} .

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindung der Summenformel $C_{42}M_{63}N_5O_{10}S$ und mit den folgenden Parametern

1H -NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin B);

^{13}C -NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin B);

UV-Spektrum (Methanol) λ_{max} (log epsilon): 225 (4,23), 250 (3,91) und 280 (3,26);

IR-Spektrum (KBr) ν : 3421, 2964, 2935, 2878, 1742, 1667, 1550, 1517 und 1235 cm^{-1} .

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindung der Summenformel $C_{41}M_{61}N_5O_{10}S$ und mit einem R_f -Wert (HPLC) unter folgenden Bedingungen:

Säule: Nucleosil 100 C-18, $7\text{ }\mu\text{m}$, $125 \times 4\text{ mm}$;

Laufmittel: Methanol/Wasser = 70/30 + 2 mM Ammoniumacetat (pH 5,0) + 10 mM Natriumdodecylsulfat;

Fluß: 1 ml/min;

Detektion: Diodenarray.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindungen mit antimykotischer und cytotoxischer Wirkung, dadurch gewinnbar, daß man

a) Archangium gephyra DSM 11 092 in einem wäßrigen Kulturmedium mit einem Gehalt an Kohlenstoff-Quellen, Stickstoff-Quellen, Schwefel-Quellen, Cyanocobalamin und Mineralsalzen aerob in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert und

b) das Adsorberharz vom Kulturmedium abtrennt und mit Methanol eluiert und vom Eluat das Methanol abzieht und

c) die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und einen Rohextrakt gewinnt und

d) den Rohextrakt einer Gelchromatographie mit Methanol als Laufmittel unterwirft und ein oder mehrere Fraktionen mit einem Gehalt an Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung im UV bei 226 nm detektiert, abtrennt und einengt,

e) das gewonnene Konzentrat an einer Umkehrphase mit Methanol/Ammoniumacetat-Puffer chromatographiert und durch Detektion im UV bei 226 nm

e1) eine Fraktion mit einer rascher laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,

e2) eine Fraktion mit einer langsamer laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,

e3) eine Fraktion mit einer noch langsamer laufenden Verbindung abtrennt,

f) von der gemäß (e1) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt,

g) von der gemäß (e2) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt und

h) von der gemäß (e3) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt.

Diese Verbindungen können dadurch gewinnbar sein, daß man bei Stufe (e) an einer C₁₈-Umkehrphase chromatographiert.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung von chemischen Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung, dadurch gekennzeichnet, daß man

a) Archangium gephyra DSM 11 092 in einem wäßrigen Kulturmedium mit einem Gehalt an Kohlenstoff-Quellen, Stickstoff-Quellen, Schwefel-Quellen, Cyanocobalamin und Mineralsalzen aerob in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert und

b) das Adsorberharz vom Kulturmedium abtrennt und mit Methanol eluiert und vom Eluat das Methanol abzieht und

c) die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und einen Rohextrakt gewinnt und

d) den Rohextrakt einer Gelchromatographie mit Methanol als Laufmittel unterwirft und ein oder mehrere Fraktionen mit einem Gehalt an Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung im UV bei 226 nm detektiert, abtrennt und einengt,

e) das gewonnene Konzentrat an einer Umkehrphase mit Methanol Ammoniumacetat-Puffer chromatographiert und durch Detektion im UV bei 226 nm

(e1) eine Fraktion mit einer rascher laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,

e2) eine Fraktion mit einer langsamer laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,

e3) eine Fraktion mit einer noch langsamer laufenden Verbindung abtrennt,

f) von der gemäß (e1) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt,

g) von der gemäß (e2) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt und

h) von der gemäß (e3) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein antimykotisches Mittel mit einem Gehalt an einer erfindungsgemäßen Verbindung.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein cytostatisches Mittel mit einem Gehalt an einer erfindungsgemäßen Verbindung.

Schließlich betrifft eine Ausführungsform der Erfindung Archangium gephyra DSM 11 092.

Nachstehend wird die Erfindung durch experimentelle Angaben und 3 Figuren (Strukturformeln) näher erläutert.

A. Produktionsbedingungen

A.1. Produktionsstamm

Das Bakterium Archangium gephyra gehört zur Ordnung der Myxococcales (Myxobakterien), Unterordnung Cystobacterineae, Familie Archangiaceae. Der Produktionsstamm Archangium gephyra Ar 315 wurde im Februar 1973 von Dr. Reichenbach aus einer Probe von einem Komposthaufen im Botanischen Garten in Freiburg, Deutschland, isoliert. Er wurde 1996 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ) unter der Nr. DSM 11 092 hinterlegt.

A.2. Stammkultur

Die Stammhaltung erfolgt auf Agarplatten, bevorzugt auf Hefe-Agar (VY/2-Agar). Dieses Medium enthält 0,5% Bäckerhefe, 0,1% CaCl₂ × 2H₂O, 0,1 µg/l Cyanocobalamin und 1,2% Agar. Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt. Das Medium wird durch Autoklavieren sterilisiert. Die Plattenkulturen werden bei 30°C bebrütet.

A.3. Morphologische Beschreibung

Die vegetativen Zellen sind lange, schlanke Stäbchen, etwa 6 bis 9 µm lang und 0,8 µm dick. Bedingt durch die Gleitbewegung der Bakterien, breiten sich die Kolonien rasch über die Kulturplatte aus. Die Schwarmkolonie auf Hefegagar ist dünn, filmartig, rötlich braun. Wie an dem um die Kolonien entstehenden Klärhof zu erkennen, werden die Hefezellen im Medium abgebaut. Auf diesem Medium bildet der Stamm oft blaßbräunliche Fruchtkörper, die aus mäandrierenden Wülsten aufgebaut sind und stark lichtbrechende Myxosporen enthalten. Letztere sind kurze, dicke, etwas unregelmäßige Stäbchen, etwa 2,5 bis 4 µm lang und 1,2 bis 1,8 µm dick.

A.4. Leistungen

Der Stamm Ar 315 produziert Substanzen, nämlich Tubulysine, die das Wachstum von Pilzen, humanen Krebszellen und anderen tierischen Zellkulturen hemmen. Die Hemmstoffe können sowohl aus den Zellen wie auch aus dem Kulturüberstand isoliert werden.

A.5. Produktion der Tubulysine

Die Substanzen werden während der logarithmischen bis hin zur stationären Wachstumsphase produziert. Eine typische Fermentation verläuft wie folgt: Ein Fermentor mit 350 l Arbeitsvolumen wird mit 300 l Kulturmedium gefüllt (Zusammensetzung: 0,5% Probion (Einzellerprotein der Fa. Hoechst); 1,0% Stärke (Cerestar Krefeld); 0,2% Glucose; 0,1% Hefeextrakt; 0,1% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1% $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0,1 µg/l Cyanocobalamin; Alternativen zu Probion sind Sojamehl oder Maiskleber). Der pH-Wert wird mit KOH auf 7,4 eingestellt. Zur Bindung der ins Medium freigesetzten Hemmstoffe wird dem Medium 1% (V/V) eines Adsorberharzes (Amberlite XAD-16, Rohm & Maas) zugesetzt. Beimpft wird mit 10 l einer 3 Tage alten Vorkultur, die im gleichen Medium in einem entsprechend kleineren Fermentor erzeugt wurde. Fermentiert wird bei 30°C mit einer Rührgeschwindigkeit von 150 U/min und einer Belüftungsrate von 10 Vol.-% pro min. Anfängliche Schaumbildung wird durch Zugabe von 50 ml Silikon-Antischaum (z. B. Tegosipon, Goldschmidt AG, Essen) verhindert. Der pH-Wert steigt im Laufe der Fermentation an. Der Anstieg wird durch Zugabe von 5-proz. Schwefelsäure auf 7,8 begrenzt. Die Fermentation wird nach 5 Tagen beendet.

B. Isolierung von Tubulysin A, B und C

Das Adsorberharz wird in einem Prozeßfilter (0,7 m², 100 Maschen (mesh)) von der Kultur abgetrennt, und mit 15 l Methanol im Verlauf von 3 h eluiert. Die Konzentration des Eluates erfolgt unter Vakuum bis zum Auftreten der Wasserphase, die anschließend dreimal mit Ethylacetat extrahiert wird. Nach Einengen der organischen Phase im Vakuum bei 30°C Badtemperatur erhält man 36 g Rohextrakt.

Dieser Rohextrakt wird durch LH-20-Gelchromatographie (Säule: d = 20 cm, l = 100 cm, Fluß 45 ml/min, Detektion 226 nm) mit dem Laufmittel Methanol nach UV-Banden in 6 Fraktionen aufgetrennt, wobei Tubulysin A, B und C in der 2. Fraktion von 110 bis 130 min enthalten sind. Nach Einengen der betreffenden Fraktion trennt man in 3 Portionen auf einer Eurosil-Bioselect (100-20-C-18)-Säule (d = 4 cm, l = 48 cm) mit dem Laufmittel Methanol/0,05 M Ammoniumacetat-Puffer (pH 7,0) = 60/40 und einem Fluß von 8 ml/min. Die Detektion erfolgt bei 226 nm. R_t Tubulysin C 245 bis 260, Tubulysin B 260 bis 285 min, Tubulysin A 300 bis 320 min.

Nach Eindampfen der vereinigten Tubulysin A, Tubulysin B und Tubulysin C enthaltenen Fraktionen bis zur Wasserphase extrahiert man mit Ethylacetat und erhält nach dem Eindampfen im Vakuum und Trocknen 420 mg Tubulysin A, 240 mg Tubulysin B und 20 mg Tubulysin C.

Tubulysin A

$\text{C}_{43}\text{H}_{55}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{S}$ [843]

DCI-MS (positiv-Ionen): 844.4543 für $[\text{M} + \text{H}]^+$

¹H- und ¹³C-NMR siehe Tabellen 1 und 2

UV (Methanol) λ_{max} (log epsilon) = 225 (4.20); 250 (3.86); 280 (3.30)

IR KBr: ν = 3390; 2959; 2934; 2876; 1747; 1667; 1553; 1515; 1233 cm⁻¹

DC: R_f = 0.27

DC-Alufolie 60 F₂₅₄ Merck. Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9 : 1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm

HPLC: R_t = 9.7 min

Säule: Nucleosil 100 C-18 7 µm, 125 × 4 mm Laufmittel: Methanol/Wasser = 70/30 + 2mM Ammoniumacetat (pH 5.0) + 10 mM Natrium-dodecylsulfat

Fluß: 1 ml/min

Detektion: Diodenarray

Tubulysin B

$\text{C}_{42}\text{H}_{53}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{S}$ [829]

DCI-MS (positiv-Ionen): 830.4361 für $[\text{M} + \text{H}]^+$

¹H- und ¹³C-NMR siehe Tabellen 1 und 2

UV (Methanol) λ_{max} (log epsilon) = 225 (4.23); 250 (3.91); 280 (3.26)

DE 196 38 870 A1

IR KBr: ν = 3421; 2964; 2935; 2878; 1742; 1667; 1550; 1517; 1235 cm^{-1}

DC: R_f = 0.25

DC-Alufolie 60 F₂₅₄ Merck. Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9 : 1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm

HPLC: R_t = 7.3 min

Säule: Nucleosil 100 C-18 7 μm , 125 \times 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 70/30 + 2 mM Ammoniumacetat (pH 5.0) + 10 mM Natrium-dodecylsulfat

Fluß: 1 ml/min

Detektion: Diodenarray

5

Tubulysin C

10

$\text{C}_{41}\text{H}_{61}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{S}$ [815]

ESI-MS (positiv-Ionen): 816.6 für $[\text{M} + \text{H}]$

HPLC: R_t = 6.8 min

Säule: Nucleosil 100 C-18 7 μm , 125 \times 4 mm.

Laufmittel: Methanol/Wasser = 70/30 + 2 mM Ammoniumacetat (pH 5.0) + 10 mM Natrium-dodecylsulfat

Fluß: 1 ml/min

Detektion: Diodenarray

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 196 38 870 A1

Tabelle ¹H-NMR data of tubulysines in [D₆] DMSO (600 MHz)

H	Tubulysin A			Tubulysin B		
	δ_H	m	J[Hz]	δ_H	m	J[Hz]
2-H	2.37	m		2.39	m	
3-H _a	1.57	m		1.55	m	
3-H _b	1.83	m		1.82	m	
4-H	4.10	m		4.11	m	
5-H	7.88	d	7.5	7.76	d	9.0
8-H	8.18	s		8.17	s	
11-H	5.74	dd	11.3, 1.4	5.75	dd	11.2, 1.6
12-H _a	2.09	m		2.08	m	
12-H _b	2.36	m		2.36	m	
13-H	4.35	m		4.35	m	
16-H	4.40	dd	9.0, 8.8	4.42	dd	9.0, 8.8
17-H	7.92	d	8.8	7.88	d	8.6
19-H	2.46	dd	7.6	2.47	m	
20-H _a	1.42	m		1.42	m	
20-H _b	1.51	m		1.52	m	
21-H _a	1.15	dd	12.5	1.16	m	
21-H _b	1.62	m	12.6	1.62	m	
22-H _a	1.36	m		1.38	m	
22-H _b	1.53	m		1.53	m	
23-H _a	1.94	m		1.93	m	
23-H _b	2.82	dd	11.4	2.83	dd	11.3
25-H ₃	2.04	s		2.05	s	
26-H ₃	1.04	d	7.0	1.05	d	7.0
27-H _a	2.66	m		2.68	m	
27-H _b	2.73	m		2.71	m	
29-H	6.96	d	8.4	6.96	d	8.4
30-H	6.61	d	8.4	6.62	d	8.3

DE 196 38 870 A1

H	Tubulysin A			Tubulysin B		
	δ_H	m	J[Hz]	δ_H	m	J[Hz]
32-H	6.61	d	8.4	6.62	d	8.3
33-H	6.96	d	8.4	6.96	d	8.4
35-H _s	2.10	s		2.11	s	
36-H	1.82	m		1.84	m	
37-H _s	0.67	d	6.5	0.68	d	6.6
38-H _s	0.97	d	6.5	0.97	d	6.4
39-H _a	5.26	d	12.0	5.27	d	12.0
39-H _b	6.19	d	12.0	6.20	d	12.0
40-H	1.93	m		1.95	m	
41-H _a	1.08	m		1.10	m	
41-H _b	1.49	m		1.49	m	
42-H _s	0.81	t	7.5	0.80	t	7.4
43-H _s	0.81	d	7.1	0.80	d	7.0
2'-H _a	2.13	m		2.15	m	
2'-H _b	2.15	m		2.18	m	
3'-H _a	1.92	m		1.48	m	
3'-H _b	-			1.50	m	
4'-H _s	0.82	d	6.9	0.82	t	7.0
5'-H _s	0.81	d	6.8			

DE 196 38 870 A1

Tabelle 2 ^{13}C -NMR data of tubulysines in $[\text{D}_6]$ DMSO (600 MHz)

C	Tubulysin A δ_{C} m	Tubulysin B δ_{C} m
1	177.1 s	177.0 s
2	36.2 d	36.0 d
3	37.6 t	37.6 t
4	49.0 d	48.9 d
6	159.7 s	159.7 s
7	149.8 s	149.7 s
8	124.2 d	124.1 s
10	168.5 s	168.7 s
11	68.8 d	69.0 d
12	34.3 t	34.4 t
13	55.8 * d	55.6 * d
15	174.2 s	174.2 s
16	52.6 d	52.6 d
18	172.8 s	172.8 s
19	68.1 d	68.0 d
20	24.8 t	24.8 t
21	22.8 t	22.7 t
22	29.6 t	29.5 t
23	54.7 t	54.6 t
25	43.8 q	43.7 q
26	18.0 q	17.9 q
27	39.5 t	39.4 t
28	128.5 s	128.4 s
29	129.9 d	129.9 d
30	114.9 d	114.9 d
31	155.5 s	155.5 s
32	114.9 d	114.9 d

C	Tubulysin A δ_c m		Tubulysin B δ_c m	
33	129.9	d	129.9	d
34	169.8	s	169.7	s
35	20.5	q	20.4	q
36	30.0	d	30.0	d
37	19.3	q	19.3	q
38	20.2	q	20.2	q
39	68.9 *	t	68.9 *	t
40	35.1	d	35.1	d
41	24.1	t	24.0	t
42	10.0	q	10.0	q
43	15.3	q	15.3	q
1'	171.3	s	171.8	s
2'	42.7	t	35.5	t
3'	25.0	d	17.6	t
4'	22.0	q	10.7	q
5'	22.0	q		

* δ_c gemessen bei 80° C

C. Wirkung

Die Tubulysine haben eine cytostatische Wirkung auf Pilze, humane Krebszelllinien und andere tierische Zellkulturen (vgl. Tabelle). Sie führen in den Zellen zu einem raschen Abbau des Mikrotubuli-Gerüsts. Das Aktinskelett bleibt erhalten. Adhärent wachsende L929-Maus-Zellen vergrößern unter dem Einfluß der Tubulysine ihr Zellvolumen, ohne sich zu teilen, und entwickeln große Zellkerne, die dann in einem apoptotischen Vorgang zerfallen.

Wirkungsspektrum

5	Pilze	Hemmhof [mm]	
		Tubulysin A	Tubulysin B
10	<i>Aspergillus niger</i>	20	18
	<i>Botrytis cinerea</i>	23	18
	<i>Coprinus cinereus</i>	20	-
15	<i>Pythium debaryanum</i>	20	-

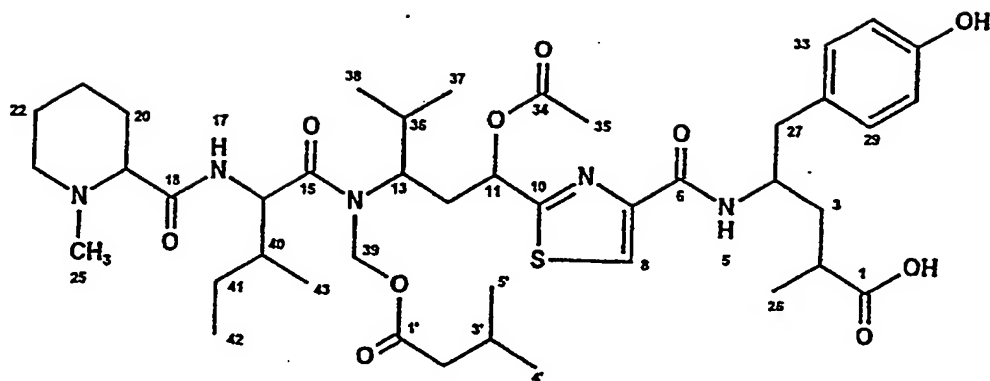
Agardiffusionstest: 20 µg pro Testblättchen von 6 mm Durchmesser

20	Humane Krebszelllinien	IC ₅₀ [ng/ml]		
		Tubulysin A	Tubulysin B	Tubulysin C
25	KB-3-1 (DSM ACC 158)	0,01	0,02	0,1
30	K-562 (ATCC CCL 243)	0,1	0,2	1,5
35	HL-60 (ATCC CCL 240)	0,04	0,08	0,4

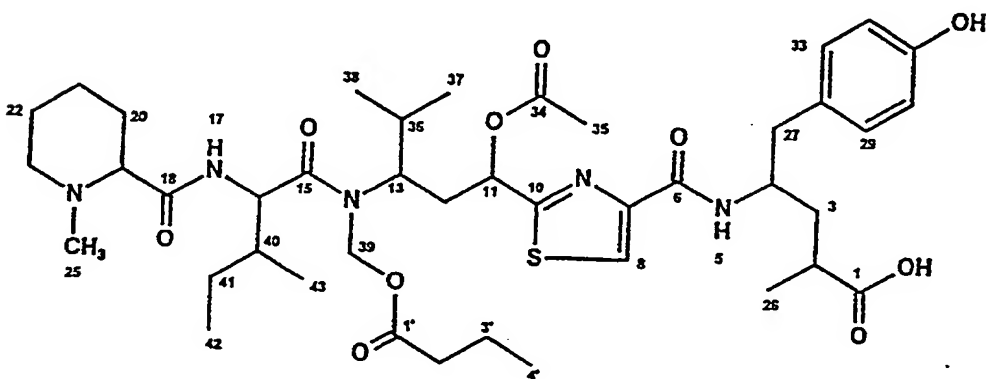
40	Tierische Zelllinien			
		Tubulysin A	Tubulysin B	Tubulysin C
45	L929, Maus (ATCC CCL 1)	0,2	0,4	2
50	Pt K2, <i>Potorous tri-</i> <i>dactylis</i> (ATCC CCL 56)	0,2	0,2	2

Patentansprüche

1. Chemische Verbindung der Formel



2. Chemische Verbindung der Formel

3. Chemische Verbindung der Summenformel $C_{43}H_{65}N_5O_{10}S$ und mit den folgenden Parametern:
¹H-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin A);

¹³C-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin A);

 UV-Spektrum (Methanol) λ_{max} (log epsilon): 225 (4,20), 250 (3,86) und 280 (3,20);

 IR-Spektrum (KBr) ν : 3390, 2959, 2934, 2876, 1747, 1667, 1553, 1515 und 1233 cm^{-1} .
4. Chemische Verbindung der Summenformel $C_{42}H_{63}N_5O_{10}S$ und mit den folgenden Parametern
¹H-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin B);

¹³C-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin B);

 UV-Spektrum (Methanol) λ_{max} (log epsilon): 225 (4,23), 250 (3,91) und 280 (3,26);

 IR-Spektrum (KBr) ν : 3421, 2964, 2935, 2878, 1742, 1667, 1550, 1517 und 1235 cm^{-1} .
5. Chemische Verbindung der Summenformel $C_{41}H_{61}N_5O_{10}S$ und mit einem R_f -Wert (HPLC) unter folgenden Bedingungen:
 Säule: Nucleosil 100 C-18, 7 μm , 125 \times 4 mm;

Laufmittel: Methanol/Wasser = 70/30 + 2 mM Ammoniumacetat (pH 5,0) + 10 mM Natriumdodecylsul-

fat;

Fluß: 1 ml/min;

Detektion: Diodenarray.

6. Chemische Verbindungen mit antimykotischer und cytotoxischer Wirkung, dadurch gewinnbar, daß man

a) Archangium gephyra DSM 11 092 in einem wäßrigen Kulturmedium mit einem Gehalt an Kohlenstoff-Quellen, Stickstoff-Quellen, Schwefel-Quellen, Cyanocobalamin und Mineralsalzen aerob in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert und

b) das Adsorberharz vom Kulturmedium abtrennt und mit Methanol eluiert und vom Eluat das Methanol abzieht und

c) die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und einen Rohextrakt gewinnt und

d) den Rohextrakt einer Gelchromatographie mit Methanol als Laufmittel unterwirft und ein oder mehrere Fraktionen mit einem Gehalt an Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung im UV bei 226 nm detektiert, abtrennt und einengt,

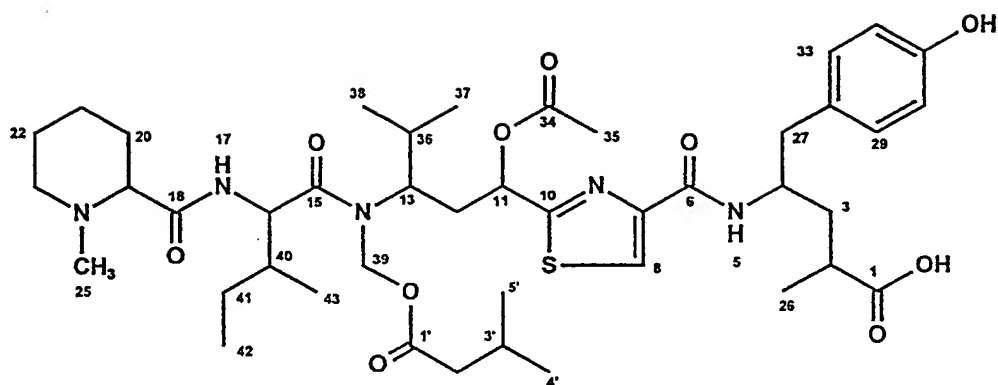
e) das gewonnene Konzentrat an einer Umkehrphase mit Methanol/Ammoniumacetat-Puffer chromatographiert und durch Detektion im UV bei 226 nm

- e1) eine Fraktion mit einer rascher laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,
 e2) eine Fraktion mit einer langsamer laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,
 e3) eine Fraktion mit einer noch langsamer laufenden Verbindung abtrennt,
 f) von der gemäß (e1) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase
 mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt,
 g) von der gemäß (e2) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase
 mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt und
 h) von der gemäß (e3) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase
 mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt.
7. Chemische Verbindungen nach Anspruch 5, dadurch gewinnbar, daß man bei Stufe (e) an einer C₁₈-Umkehrphase chromatographiert.
8. Verfahren zur Gewinnung von chemischen Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung, dadurch gekennzeichnet, daß man
- a) Archangium gephyra DSM 11 092 in einem wäßrigen Kulturmedium mit einem Gehalt an Kohlenstoff-Quellen, Stickstoff-Quellen, Schwefel-Quellen, Cyanocobalamin und Mineralsalzen aerob in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert und
 b) das Adsorberharz vom Kulturmedium abtrennt und mit Methanol eluiert und vom Eluat das Methanol abzieht und
 c) die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und einen Rohextrakt gewinnt und
 d) den Rohextrakt einer Gelchromatographie mit Methanol als Laufmittel unterwirft und ein oder mehrere Fraktionen mit einem Gehalt an Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung im UV bei 226 nm detektiert, abtrennt und einengt,
 e) das gewonnene Konzentrat an einer Umkehrphase mit Methanol Ammoniumacetat-Puffer chromatographiert und durch Detektion im UV bei 226 nm
- e1) eine Fraktion mit einer rascher laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,
 e2) eine Fraktion mit einer langsamer laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,
 e3) eine Fraktion mit einer noch langsamer laufenden Verbindung abtrennt,
 f) von der gemäß (e1) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt,
 g) von der gemäß (e2) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt und
 h) von der gemäß (e3) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt.
9. Antimykotisches Mittel mit einem Gehalt an einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7.
 10. Cytostatisches Mittel mit einem Gehalt an einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7.
 11. Archangium gephyra DSM 11 092.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

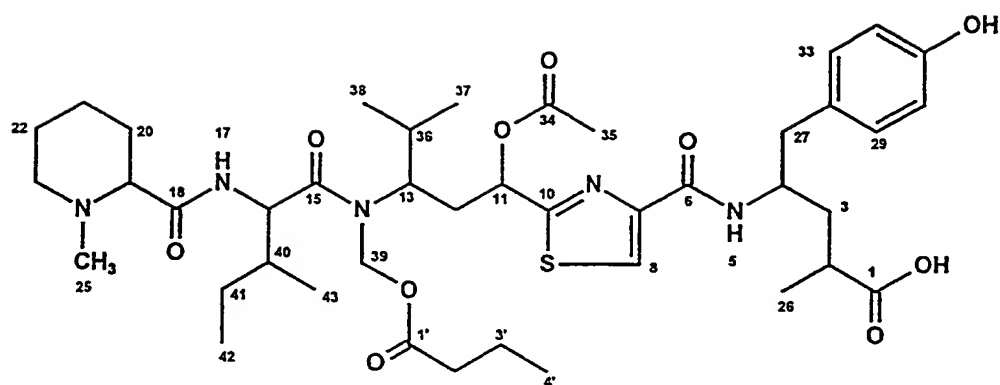
- Leerseite -

Fig. 1



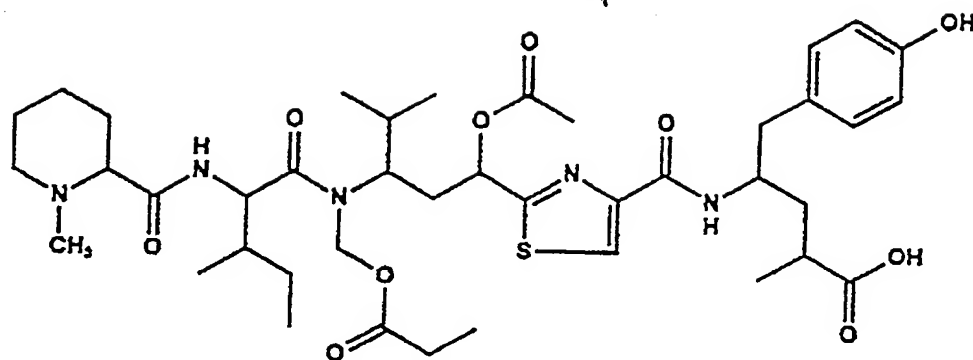
Tubulysin A

Fig. 2



Tubulysin B

Fig. 3



Tubulysin C

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.